

氏 名	おち 落 合 あい 秋 あき ひと 人
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1679 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 食 品 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Physiological and X-ray Crystallographic Studies on Plant Cell Wall Polysaccharides-degrading Lyases from Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria (植物細胞壁多糖の分解に関わる植物病原性及び腐生性細菌由来リアーゼの生理学的・X線結晶学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 村 田 幸 作 教 授 清 水 昌 教 授 井 上 國 世

論 文 内 容 の 要 旨

細菌は各種生物（宿主：動物、植物、微生物）と相互作用しており、その仕方により病原細菌、腐生（枯死体を栄養源にする）細菌、及び共生細菌に大別される。枯草菌（*Bacillus subtilis*）は、植物に対して腐生性或いは共生性を示す。枯草菌の一種である納豆菌もイネ稈に多数存在し、その植物腐生性を利用して伝統的に納豆が製造されている。しかし、枯草菌の植物腐生・共生性の分子機構は殆ど不明である。

細菌が植物に対して示す病原性や腐生性を理解するためには、細菌による植物細胞壁多糖の分解に関わる分子機構を明らかにすることが必要である。種子植物などの細胞壁は、主にペクチン、セルロース、ヘミセルロースの3種の多糖で構成されており、さらにペクチンは、ポリガラクトツロナン、ラムノガラクトツロナン-I（RG-I）、及びラムノガラクトツロナン-II（RG-II）の3つの領域に分類される。藻類の一種である褐藻の細胞壁には、フコイダンやアルギン酸などの酸性多糖が多く含まれている。植物病原性（*Erwinia* 属や *Xanthomonas* 属）細菌によるポリガラクトツロナンの分解（酵素：ポリガラクトツロナーゼ、ペクチンリアーゼ及びペクチン酸リアーゼ）に関する研究は進展しているが、複雑なヘテロ多糖であるRGの細菌による分解に関する知見は乏しい。

本研究では、植物腐生性細菌 *B. subtilis* と植物病原性細菌 *Agrobacterium tumefaciens* に焦点を当て、それらの植物細胞壁多糖の分解機構を主に分子生物学と構造生物学の観点から解析した。

第1章では、DNA マイクロアレイ解析と酵素・遺伝学的解析により、*B. subtilis* における植物細胞壁多糖RG-Iの分解に関わる3種類の遺伝子クラスター（*yesOPQRSTUVWXYZ*, *ytePQRST*, 及び *ybcMOPST-ybdABDE*）を見出し、RG-Iの分解機構を明らかにした。Yes遺伝子クラスター中で分泌シグナルをもつYesWとYesX（互いに68.7%の相同性を示す）は、RG-I主鎖のラムノースとガラクトツロン酸間の α -1,4結合を β -脱離反応で切断する菌体外RGリアーゼであった。YesWは、RG-I主鎖から主に不飽和4糖（ Δ GRGR）以上のオリゴ糖を遊離させるエンド型酵素であり、YesXはRG-I主鎖に対してエキソ型で作用し不飽和2糖（ Δ GR）のみを遊離させる。YesとYte遺伝子クラスター中のYesRとYteRは、不飽和2糖（ Δ GR）を単糖に分解する細胞質局在性の不飽和ガラクトツロニルヒドロラーゼである。従って、RG-Iは菌体外でYesWとYesXの協奏的な作用により不飽和2糖（ Δ GR）にまで分解され、生じた2糖は細胞質に取り込まれた後にYesRとYteRの作用により単糖に分解されることが分かった。

第2章では、RGリアーゼYesWとYesXのX線結晶構造を決定し、両酵素における作用様式（エンド型/エキソ型）に関わる構造要因を明らかにした。YesWとYesXの結晶は、各々2-メチル-2,4-ペンタンジオールとポリエチレングリコール（PEG）3350を沈殿剤とした条件で、シッティングドロップ蒸気拡散法により調製した。YesWは、他の高次構造既知のタンパク質と一次構造上の相同性を示さないため、Au誘導体を用いた単波長異常分散（SAD）法により位相を決定し、初期

モデルを構築した。YesXの構造は、YesWの構造をサーチモデルとした分子置換法により決定した。最終的に、YesWとYesXの高次構造モデルを各々R因子16.4%；16.4%，free R因子18.2%；18.6%まで精密化した。YesWとYesXの高次構造は8枚羽根（A～H）の β -プロペラを基本骨格とし、N末端側に逆平行 β -シートドメインをもつ。カルシウムイオンが、各羽根（Dを除く）に認められた。両酵素の β -プロペラ構造は、他の多糖リアーゼには見られない新規なフォールドであった。

YesWとガラクトuron酸2糖との複合体の構造を決定した結果、糖は β -プロペラの中心に位置するクレフトに結合していた。この複合体とYesXの高次構造を重ね合わせたところ、YesXのみに見られるループ構造が活性中心に結合する2糖の非還元末端側を覆い被さるように位置していることが分かった。そのため、このループ構造が長鎖基質の活性中心への結合を制限し、YesXがエキソ型活性を示すことの構造要因となっていることが示唆された。そこで、YesXの活性中心におけるループ構造を欠失した変異体を作製し、その作用様式を調べた。基質RG-Iに対する反応産物を解析したところ、変異体は不飽和2糖のみを遊離させるYesXのエキソ型活性を喪失し、ランダム鎖長のオリゴ糖を遊離させるYesW様のエンド型活性を示した。

第3章では、*A. tumefaciens*におけるアルギン酸オリゴ糖の分解機構、並びにエキソ型アルギン酸リアーゼの高次構造を明らかにした。*A. tumefaciens* C58株はアルギン酸を資化できないが、*Sphingomonas* sp. A1株のアルギン酸取り込み・分解遺伝子クラスター（*atu3021*～*3025*）をゲノムに有する。そこで、その生理的意義を解析した結果、Atu遺伝子クラスターはアルギン酸オリゴ糖によって発現誘導され、それに含まれる遺伝子の密接な発現制御によりアルギン酸オリゴ糖の資化に機能することを明らかにした。クラスター中のAtu3025は、非還元末端側から単糖を遊離させるエキソ型活性を示す細胞質局在性のアルギン酸リアーゼである。

Atu3025は他の高次構造既知のタンパク質と一次構造上の相同性を示さないため、PEG4000を沈殿剤とした条件で得たセレノメチオニン誘導体結晶を用いたSAD法により位相を決定した。Atu3025の高次構造モデルは、 $\alpha 6/\alpha 6$ -バレルドメインと β -シートドメインを持つ。この $\alpha 6/\alpha 6$ -バレルドメインとエンド型アルギン酸リアーゼA1-Ⅲには一次構造上の相同性は殆ど見られないが、高次構造は類似している。A1-Ⅲ変異体と基質との複合体及びAtu3025の高次構造を重ね合わせると、活性中心においてAtu3025に特異なループ構造が見られ、このループ構造がAtu3025のエキソ型活性に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

多糖は、微生物から植物・動物に至るまで広く存在し、自然界でのエコシステムの構築、エネルギー貯蔵や細胞形態維持などに重要な機能を果たしている。細胞形態維持に関わる多糖として、哺乳動物の細胞外マトリックス（ヒアルロン酸、コンドロイチンなど）、植物の細胞壁（ペクチン、セルロース、ヘミセルロースなど）や微生物の莢膜バイオフィルム（アルギン酸、ジェラン、キサントランなど）がよく知られている。

細菌による宿主の細胞表層多糖の分解は、両者が相互作用する際の初期応答の一つである。そのため、細菌における植物細胞壁分解機構に関する研究は、植物細胞壁多糖に対する細菌の分子応答機構を明らかにし、未利用バイオマスの有効利用や植物の細菌感染症予防に繋がる。植物細胞壁多糖の構成成分であるペクチンは、ポリガラクトuronan、ラムノガラクトuronan-I（RG-I）、及びラムノガラクトuronan-II（RG-II）の3つの領域から成る。藻類の一種である褐藻の細胞壁には、フコイダンやアルギン酸などの酸性多糖が多く含まれている。

本研究は、植物腐生性細菌 *Bacillus subtilis* におけるRG-Iの分解と植物病原性細菌 *Agrobacterium tumefaciens* におけるアルギン酸の分解について、代謝経路の確定とそれに関わる分子（遺伝子と酵素）の同定、及び多糖リアーゼのX線結晶構造解析を行ったものである。評価すべき点は、以下の通りである。

1. *B. subtilis* における植物細胞壁多糖RG-Iの分解に関わる遺伝子クラスターの機能解析により、RG-I代謝経路及びそれに関わる遺伝子と酵素を同定した。これにより、初めて細菌におけるRGリアーゼYesWとYesXを初発酵素とするRG-Iの新規な完全分解機構を明らかにした。
2. X線結晶構造解析によりエンド型RGリアーゼYesWの高次構造を決定し、その基本骨格である β -プロペラ構造と基質

認識機構を明らかにした。 β -プロペラ構造は、多糖リアーゼでは新規なフォールドである。

3. エンド型 YesW とエキソ型 YesX の比較構造解析により、エンド型/エキソ型の作用様式に関わる構造要因（非還元末端糖を覆うループ構造）を決定した。このループ構造を欠失させることにより、YesX のエキソ型活性が YesW 様のエンド型活性に変換することを示した。
4. エキソ型アルギン酸リアーゼ Atu3025 の遺伝子を含むアルギン酸取り込み・分解遺伝子クラスターの発現により、*A. tumefaciens* がアルギン酸オリゴ糖を資化することを明らかにした。
5. X線結晶構造解析により決定した Atu3025 の高次構造は、 $\alpha 6/\alpha 6$ -バレルドメインと β -シートドメインから構成される。 $\alpha 6/\alpha 6$ -バレルドメインは、*Sphingomonas* sp. A1 株由来のエンド型アルギン酸リアーゼ A1-Ⅲ と高次構造上高い相同性を示す。Atu3025 と A1-Ⅲ の活性中心の構造を比較し、エキソ型活性を規定する構造要因を特定した。

以上のように、本論文は、植物病原性及び腐生性細菌における多糖リアーゼを初発酵素とする植物細胞壁多糖（ラムノガラクトuronan とアルギン酸）の分解機構を明らかにすると共に、高次構造情報に基づいて多糖リアーゼの反応様式（エンド型/エキソ型）を分子変換する技術を確立したものであり、酵素化学、構造生物学、タンパク質工学、生物機能変換学、及び応用微生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。